

Aus dem Zentrum für Innere Medizin am Klinikum der JLU
63 Gießen, Klinikstr. 32b
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-G. Lasch

Einfluß von Spironolactone auf den Eiweißgehalt subzellulärer Leberfraktionen und der Niere bei subtotal nephrektomierten Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Hans-Georg Radny
aus Marburg/Lahn

Gießen 1974

Aus dem Zentrum für Innere Medizin am Klinikum der JLU
63 Gießen, Klinikstr. 32b
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-G. Lasch

**Einfluß von Spironolactone auf den Eiweißgehalt
subzellulärer Leberfraktionen und der Niere
bei subtotal nephrektomierten Ratten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Hans-Georg Radny
aus Marburg/Lahn

Gießen 1974

Ans dem Zentrum für humane Medizin am Klinikum der HU
42 Gießen, Klinikstr. 35b
Geschäftsführer: Dr. med. habil. Hans-Joachim Lippert

Einfluß von Spironolacton auf den Eiweißgehalt
subzellulärer Leberfraktionen und der Niere
bei subakut nephritischem Ratten

Freigegeben für
an die Bibliothek
des
der



- Dekan: Prof. Dr. D. Ringleb
1. Berichterstatter: Doz. Dr. Leber
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Schulze

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
Fragestellung	2
II. Material und Methoden	3
III. Ergebnisse	8
IV. Diskussion	12
V. Zusammenstellung der wesentlichsten Ergebnisse	22
VI. Schlußbetrachtung	23
VII. Tabellen	24
VIII. Literaturverzeichnis	31

Einleitung:

Die mischfunktionellen Oxygenasen (38) gehören zu den mikrosomalen Enzymen der Leberzelle, die am Abbau vieler körpereigener und körperfremder Stoffe beteiligt sind. Sie katalysieren die Einführung eines Sauerstoffatoms in das Substratmolekül. Für die Aktivierung des Sauerstoffs spielt das mikrosomale Hämoprotein Cytochrom P 450 eine entscheidende Rolle. Das zweite Sauerstoffatom wird durch NADPH_2 zu Wasser reduziert.

Die Einführung oder Freilegung polarer Gruppen durch mikrosomale Enzyme ermöglichen es dem Organismus auch lipophile Verbindungen, die für die Nieren primär nicht ausscheidungsfähig sind, in harnfähige Produkte umzuwandeln.

Mikrosomale Enzyme haben einen wesentlichen Anteil an der Elimination vieler Pharmaca und eine Beeinträchtigung mikrosomaler Enzymfunktionen läßt eine Kumulation und dadurch u. U. toxische Wirkungen dieser Substanzen für den Organismus erwarten.

Aus den Befunden von Renner et al. (18), Hicks et al. (8), Young und Wooton (37) und Müting (16) geht hervor, daß in der Urämie vielfältige Stoffwechselstörungen vorliegen, wobei zahlreiche Enzymsysteme in ihrer Funktion beeinträchtigt sind.

Leber et al. (14, 15) haben an isolierten Lebermikrosomen urämischer Ratten festgestellt, daß die spezifische Aktivität mischfunktioneller Oxygenasen und der spezifische Cytochrom P 450-Gehalt signifikant vermindert sind; nicht signifikant verändert waren die spezifischen Aktivitäten der Glucose-6-Phosphatase, der Glucuronyltransferase und der Gehalt an Cytochrom b_5 . Außerdem war es bei den urämischen Tieren zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichts, des absoluten Leberfeuchtgewichts und des auf 1 g Leber bezogenen relativen mikrosomalen Leberproteingehalts gekommen.

Durch zahlreiche Untersuchungen an Ratten und Mäusen wurde nachgewiesen, daß Spironolactone neben seiner bekannten Wirkung auf den Mineralhaushalt in der Leber die Synthese mischfunktioneller Oxygenasen, des Cytochrom P 450 und der Glucuronyltransferase stimuliert und so den Abbau vieler körpereigener und körperfremder Substanzen beschleunigt (3-7, 10, 12, 13, 20-24, 26-29, 31-33). Unverändert blieb die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (13) und der Gehalt an Cytochrom b_5 (13, 32) nach Spironolactonebehandlung. Einige Autoren berichteten außerdem über eine signifikante Zunahme des Lebergewichts (4-6, 32, 19) und des mikrosomalen Proteingehalts (4-6) nach Spironolactonegabe.

Die Darstellung des Einflusses von Spironolactone einerseits und der Urämie andererseits auf Proteinsynthese und bestimmte mikrosomale Funktionen der Leberzelle zeigt, daß die Auswirkungen entgegengesetzt sind.

Aus diesem Grunde schien uns Spironolactone geeignet zu prüfen, welche Einwirkungen diese Substanz auf die einzelnen Eiweißfraktionen der Leberzelle bei urämischen Ratten hat.

Die von Horvath (8) geschilderte Zunahme der mitotischen Aktivität der Leberzellen bei teilhepatektomierten Ratten führte uns weiterhin zu der Frage, ob Spironolactone auch auf die Regenerationsfähigkeit der Niere bei subtotal nephrektomierten Tieren einen ähnlichen Einfluß ausübt und dadurch eine Besserung der Nierenfunktion eintritt. Deshalb bestimmten wir neben dem Eiweißgehalt der Niere auch Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Serum bei den Versuchstieren.

Material und Methoden

Die Versuche wurden mit 140 - 160 g schweren männlichen SIV-Ratten (S. Ivanovas Med. Versuchstierfarm Kisslegg/Allgäu) durchgeführt. 4 - 6 Tiere wurden in einem Käfig gehalten und erhielten Altromin-Standard-Futter und Wasser ad libitum. Die Urämie wurde durch subtotale Nephrektomie erzeugt. Die Narkose wurde durch ip. Injektion von Evipan-Natrium (10 mg/100 g Kg in 0,2 ml aqu. dest.) eingeleitet und durch Äther bis zum Ende der Operation aufrechterhalten. Bei der Operation wurde zunächst die rechte Niere total entfernt und von der anderen soviel Parenchym, daß nur 12 - 15 % des Gesamtgewichts beider Nieren im Tier zurückblieben. Die Blutung des linken Nierenparenchymrests wurde durch einen "Gewebekleber" (Histoacryl der Fa. Braun Melsungen) gestillt. Die Operation wurde durch schichtweisen Wundverschluß beendet.

An dem der Operation folgenden Tag wurde einer intakten und einer subtotal nephrektomierten Tiergruppe erstmals 2 x 3 mg Spironolactone / 100 g Kg x d. in jeweils 0,3 ml aqu. dest. ip. injiziert. Intakte und subtotal nephrektomierte Kontrolltiere erhielten gleiche Volumina 0,9 % NaCl-Lösung ip. Diese Behandlung wurde insgesamt 11 Tage durchgeführt. Außerdem wurden alle Tiere in dieser Zeit täglich gewogen.

Am 12. Tag nach der Operation erhielten Tiere aller Gruppen 15 μ Ci/100 g Kg Arginin-(Guanido- ^{14}C) (Fa. New England Nuclear Boston) ip. injiziert. Das verwendete Arginin-(Guanido- ^{14}C) besaß die spezifische Aktivität von 26 mCi/mM. Die Guanido- ^{14}C -Gruppe eignet sich besonders, da sie nach Abspaltung von Ornithin durch die Arginase (Argininabbau) als Harnstoff ausgeschieden wird, also die Messung nicht durch Reutilisation störend beeinflusst.

Ein Teil der Tiere wurde 2 Std., ein anderer 6 Std. nach Markierung unter Äthernarkose dekapitiert, wobei gleichzeitig Blut aus den eröffneten Carotiden zur Bestimmung von Harnstoff und Kreatinin ent-

nommen wurde. Beide Bestimmungen wurden mit Hilfe des Autoanalyzers im hiesigen Institut für klinische Chemie durchgeführt. An dieser Stelle sei Herrn Professor Róka (Direktor des Institutes für klinische Chemie) herzlich gedankt.

Im Anschluß an die Entblutung wurden die Lebern, Nieren und Nierenparenchymreste entnommen und ihr Gewicht bestimmt. Bis zur Aufarbeitung wurden die Organe bei -25 Grad tiefgefroren und luftdicht aufbewahrt. Mit den nichtmarkierten Tieren wurde ebenso verfahren.

Die Präparation der Lebermikrosomen erfolgte nach dem von W.C. Schneider angegebenen Verfahren: Die Leber wurde in kleinere Stücke zerschnitten und in Tris-Saccharose-Puffer gespült, um eventuell anhaftendes Blut zu entfernen. Diese so "gesäuberten" Leberstückchen wurden in das "Potterglas" gegeben und mit 3 ml Tris-Saccharose-Puffer (0,1m Tris-HCl-Puffer; pH: 7,4 mit 0,25m Saccharosegehalt) auf 1 g Leber aufgefüllt und bei Eiskühlung in einem Homogenisator (nach Potter u. Elvehjem) knapp 1 min homogenisiert. Anschließend wurden Volumen und Eiweißkonzentration vom Homogenat bestimmt.

Die Trennung der Zellbestandteile des Homogenats geschah durch 20minütiges Zentrifugieren bei 12 000g in der Servall-Zentrifuge RC 2, Rotor SS 34. Dabei werden Zelldedritus, Zellkerne und Mitochondrien zur Sedimentation gebracht. Dieser "Rückstand" wurde in Tris-Saccharose-Puffer aufgenommen und Volumen und Eiweißkonzentration gemessen. Der "Überstand" wurde nun 60 min bei 105 000g zentrifugiert (Spincozentrifuge L50) und die Mikrosomenfraktion als Niederschlag erhalten. Volumen und Proteingehalt des Überstandes wurden festgehalten. Die Mikrosomenfraktion wurde in 0,15m KCl-Lösung suspendiert und erneut 60 min bei 105 000g in der Spincozentrifuge zentrifugiert, um verunreinigendes Hämoglobin zu entfernen. Die "gewaschene" Mikrosomenfraktion wurde mit 0,1m Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) auf 3 ml aufgefüllt und nach Plümpern das Volumen und der Eiweißgehalt bestimmt.

Durchführung der Proteinbestimmung nach Biuret modifiziert nach Beisenherz et al. (2) und Bode et al. (1) dargestellt am Beispiel der Mikrosomenfraktion:

Zu 0,1 ml Mikrosomensuspension wurde 0,75 ml aqu.dest. pipettiert und mit 0,15 ml 3M Trichloressigsäure versetzt, wodurch das Eiweiß ausgefällt wurde. Nach 3minütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 5 ml Biuret-Reagenz aufgenommen. Der Niederschlag wurde nun im Biuret-Reagenz so lange geplümpert bis keine Flocken mehr in der Lösung sichtbar waren. Die völlig klare Lösung wurde dann 30 min stehen gelassen. Nach dieser Reaktionszeit mit dem Biuretreagenz wurden 5 ml aqu.dest. zugemischt und 5 ml der verdünnten Lösung in ein weiteres Reagenzglas pipettiert und mit 0,2 ml 15 % KCN versetzt, was nach kurzem Durchrühren zur vollständigen Entfärbung des Biuretkomplexes führte.

Die Extinktionen von Proben und Leerwerten (5 ml Biuret-Reagenz und 5 ml aqu.dest.) wurden mit Beckmans Photometer bei 546 nm und 1 cm Schichtdicke gemessen.

Alle Proben und Leerwerte wurden doppelt angesetzt und der Mittelwert zur Berechnung der Proteinkonzentration eingesetzt.

Die Mikrosomenextraktion wurde nach dem von Omura et al. (17) angegebenen Verfahren durchgeführt:

Eine Mikrosomensuspension mit der Konzentration von 10 mg Mikrosomenprotein/ml wurde mit aqu.dest. auf 4 ml aufgefüllt und 6 ml 20 % Trichloressigsäure hinzugegeben (Endkonzentration 12 % Trichloressigsäure) und das Eiweiß dadurch gefällt. Nach 3minütigem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert und das Präzipitat mit 2 ml 5 % Trichloressigsäure gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Die Abtrennung der Lipide aus dem Rückstand wurde durch Extraktion mit 5 ml Chloroform-Methanol (2:1) bewirkt. Dieser Extraktionsvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand 20 min in 90 Grad heißer Trichloressigsäure inkubiert bzw. extrahiert um Ribonukleinsäuren zu entfernen. Dieser Rückstand wurde mit 5 ml 40 Grad warmem Äthanol gewaschen, zentrifugiert und der Rückstand bzw. das RNA- und lipidfreie Mikrosomenprotein mit 1 ml Aceton getrocknet.

Messung der Einbaurate von Arginin-(Guanido- ^{14}C) (Hersteller: Fa. New England Nuclear Boston) mit dem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3380/544 dargestellt am Beispiel des Mikrosomeneiweißes:

Zu 10 mg Mikrosomeneiweiß wurden nach der o. a. Extraktion 0,05 ml aqu.dest. und 1 ml Soluene TM-100 (Fa. Packard) gegeben und diese Mischung bei 56 Grad inkubiert. Soluene enthält eine quartäre Ammoniumbase und führt zur vollständigen Eiweißhydrolyse. Sobald die Flüssigkeit völlig klar war, d. h. keine "Flocken" mehr sichtbar waren, gaben wir 10 ml Scintillatorflüssigkeit (42 ml Liquifluor der Fa. New England Nuclear auf 1000 ml Toluol der Fa. Merck) zu unserer Probe. Alle Proben wurden doppelt angesetzt und zweimal jeweils 10 min gezählt.

Die Eichung des Flüssigkeitsscintillationszählers wurde freundlicherweise von Herrn Dr. med. Matthias (wissenschaftlicher Assistent der medizinischen Klinik) mittels genau festgesetzter Eiweißmengen: 5 mg, 10 mg, 15 mg und 20 mg durchgeführt. Ihm sei an dieser Stelle besonders gedankt. Er ermittelte die zu den verschiedenen Eiweißkonzentrationen gehörenden Quenchgrade (Löscheffekt für Lichtimpulse durch unspezifische Trübung) und erhielt dadurch die verschiedenen Wirkungsgrade (Wirkungsgrad und Quenchgrad sind zueinander reziprok). Wir lagen mit den vorgegebenen Eiweißkonzentrationen in einem Wirkungsgradbereich von 0,4 - 0,7 (Wirkungsgrad 1 = 100 %). Bei einer Vorgabe von 10 mg Nieren-, Mitochondrien- oder Mikrosomeneiweiß bewegten wir uns mit unseren Zählungen in einem Wirkungsgradbereich von 0,5 - 0,6.

Auch die Nieren und Nierenparenchymreste wurden homogenisiert, der Eiweißgehalt bestimmt, das Eiweiß extrahiert und die Proben anschließend zur Impulszählung in den Flüssigkeitsscintillationszähler gegeben. Für die Nierenparenchymreste der subtotal nephrektomierten Ratten wurde noch der Hypertrophiefaktor errechnet. Als Maß für die Hypertrophie gilt das Gewicht des hypertrophierten Nierenrests

dividiert durch die Differenz vom Gewicht der Normalniere und dem Gewicht des resezierten Teils.

$$\text{Hypertrophiefaktor} = \frac{\text{Gewicht des hypertroph. Nierenrestes}}{\text{Gewicht der Normalniere minus Gewicht des resezierten Teiles}}$$

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der "Student"-Verteilung durchgeführt.

Folgende Tiergruppen wurden miteinander verglichen:

Gruppe 1: Kontrolltiere (intakte Tiere)	n = 37
Gruppe 2: Kontrolltiere mit Aldactone (intakte Tiere)	n = 46
Gruppe 3: Urämische Tiere (subtotal nephrektomiert)	n = 37
Gruppe 4: Urämische Tiere mit Aldactone (subtot. nephrektomiert)	n = 46

Ergebnisse:

Tabelle 1

Körperendgewicht in % des Ausgangsgewichts:

	Kontrolltiere	Kontrolltiere mit Aldactone	Urämische Tiere	Uräm. Tiere mit Aldactone
	n = 37	n = 46	n = 37	n = 46
Körperend- gewicht %	132,5 + 8,6 ⁺	119,7 + 4,9 ^o	91,9 + 6,4 ^x	97,1 + 5,5 ^x

Signifikanz: p 0,01: + gegenüber o, + gegenüber x, + gegenüber x.
o gegenüber x, o gegenüber x, x gegenüber x.

Die Gewichtstabelle zeigt das Körperendgewicht in % des Ausgangsgewichts 11 Tage nach der Operation. Das Körperendgewicht der Normaltiere lag signifikant höher als das der Kontrolltiere mit Spironolactone. Das Ausgangsgewicht wurde von diesen beiden Gruppen erheblich überschritten. Bei den urämischen Tieren wiesen die behandelten ein signifikant höheres Körperendgewicht auf. Die unbehandelten urämischen Tiere lagen am Versuchsende deutlich unter ihrem Ausgangsgewicht.

Das Nierengewicht in mg (s. Tab. 2, S. 24) war bei den Normaltieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren mit Spironolactone. Die urämischen Tiere mit und ohne Spironolactone wiesen keine signifikanten Nierengewichtsunterschiede auf. Das relative Nierengewicht in mg/100 g Kg (s. Tab. 2, S. 24) ließ weder unter den operierten noch unter den nichtoperierten Tieren signifikante Gewichtsunterschiede erkennen. Ebenso zeigte auch der "Regenerationsfaktor" (als Hypertrophiefaktor auf S. 6 beschrieben) des intraoperativ belassenen Nierenrestes (s. Tab. 2, S. 24) keinen signifikanten Unterschied bei behandelten und unbehandelten urämischen Tieren. Auch bei den übrigen Nierenparametern wie Nierenproteingehalt (mg), relativem Nierenproteingehalt (mg Prot./100 mg N), Kreatinin- und Harnstoffkonzen-

trationen in mg% (s. Tab. 2, S. 24), so wie den Einbauraten von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in dpm/10 mg Nieren-Prot. x min (s. Tab. 3, S. 25) in das Nierenprotein 2 und 6 Std. nach Markierung ergaben sich bei den behandelten und unbehandelten urämischen Tieren keine signifikanten Unterschiede.

Absoluter und relativer Nierenproteingehalt lagen bei den Kontrolltieren mit Spironolactone signifikant höher als bei den Normaltieren (s. Tab. 2, S. 24). Zwischen Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen behandelter und unbehandelter Kontrolltiere konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Tab. 2, S. 24). Bei den Einbauraten von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in das Nierenprotein 2 und 6 Std. nach Markierung fanden sich zwischen den 4 Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 3, S. 25).

Wie aus Tab. 4, S. 26 zu entnehmen ist, zeigen Kontrolltiere mit und ohne Spironolactone und behandelte urämische Tiere keine signifikanten Unterschiede im Lebergewicht. Spironolactone-behandelte subtotal nephrektomierte Ratten wiesen ein signifikant höheres absolutes und relatives Lebergewicht als unbehandelte auf. Das relative Lebergewicht behandelter urämischer Tiere (s. Tab. 4, S. 26) übertraf signifikant das aller übrigen Gruppen.

Der Proteingehalt des Leberhomogenats (s. Tab. 4, S. 26) ergab bei den Kontrollgruppen und den behandelten urämischen Tieren keinen signifikanten Unterschied; der Proteingehalt unbehandelter urämischer Tiere lag signifikant niedriger als bei allen anderen Gruppen. Wenn der Proteingehalt auf das g Leber bezogen wurde (s. Tab. 4, S. 26), übertraf die behandelte urämische Gruppe signifikant die unbehandelte urämische Gruppe (Signifikanz durch einfache Varianzanalyse nachgewiesen).

Auch bei dem Eiweißgehalt der Mitochondrienfraktion zeigten die unbehandelten urämischen Tiere den signifikant niedrigsten Wert (s. Tab. 5, S. 27). Der Eiweißgehalt der behandelten Kontrollgruppe

übertraf signifikant alle übrigen Gruppen; der Eiweißgehalt der behandelten urämischen Gruppe lag signifikant über dem der Normaltiere (s. Tab. 5, S. 27). Bezogen auf das g Leber war der Eiweißgehalt bei den behandelten Tieren signifikant höher als bei den unbehandelten Gruppen, wobei die unbehandelte urämische Gruppe wieder den signifikant niedrigsten Wert aufwies (s. Tab. 6, S. 28). Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß die Mitochondrienfraktion zu ca. 60 % mit Zelltrümmern und Kernen verunreinigt ist und daher die Ergebnisse im Hinblick auf die Mitochondrien nur unter Vorbehalt zu werten sind.

Die Normaltiere übertrafen mit ihrem Eiweißgehalt bei der Hyaloplasmafraktion signifikant alle übrigen Gruppen (s. Tab. 5, S. 27). Die behandelten urämischen Tiere überschritten ihrerseits signifikant die behandelte Kontrollgruppe und die unbehandelte urämische Gruppe, die sich statistisch nicht signifikant voneinander unterschieden. Hinsichtlich des relativen Proteingehalts (mg Prot./g Leber) lagen die unbehandelten urämischen Tiere signifikant höher als die behandelten (s. Tab. 6, S. 28). Zwischen den urämischen Tiergruppen und den Normaltieren bestand statistisch kein Unterschied. Die behandelten Kontrolltiere wiesen den signifikant niedrigsten Wert von allen Gruppen auf (s. Tab. 6, S. 28).

Den signifikant höchsten absoluten und relativen Eiweißgehalt wies die behandelte Kontrollgruppe bei der Mikrosomenfraktion auf (s. Tab. 5 u. 6, S. 27, 28). Es bestand kein statistischer Unterschied zwischen Normaltieren und behandelten subtotal nephrektomierten Tieren bei beiden Parametern. Die unbehandelte urämische Gruppe ließ die signifikant niedrigsten Werte erkennen (s. Tab. 5 u. 6, S. 27, 28).

Auch wenn das Mikrosomenprotein in % des Homogenatproteins ausgedrückt wurde, zeigte die behandelte Kontrollgruppe den signifikant höchsten Wert (s. Tab. 5, S. 27). Die Normaltiere lagen signifikant höher als die subtotal nephrektomierten Gruppen, wobei auch hier wieder die unbehandelte urämische Gruppe den signifikant niedrigsten

Wert aufzeigte (s. Tab. 5, S. 27).

Die Einbauraten von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in das Protein der Leber-mitochondrienfraktion nach einer Markierungszeit von 2 Std. waren bei den einzelnen Gruppen gleich (s. Tab. 7, S. 29). Nach 6 Std. wiesen die behandelten Kontrolltiere die signifikant höchste Einbaurrate auf. Gefolgt wurde diese Gruppe von den Normaltieren, die die Werte der subtotal nephrektomierten Tiere signifikant überschritten. Die operierten Tiere zeigten statistisch keine unterschiedlichen Einbauraten (s. Tab. 7, S. 29).

2 Std. nach Markierung mit Arginin-(Guanido-¹⁴C) ließen die Normaltiere die signifikant höchste Einbaurrate in das Lebermikrosomenprotein erkennen (s. Tab. 8, S. 30). Die behandelten Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Einbaurrate der unbehandelten urämischen Gruppe unterschritt signifikant alle übrigen Werte (s. Tab. 8, S. 30). Nach 6 Std. lagen die Werte der behandelten Kontrolltiere signifikant über den Werten der operierten Tiere. Kein statistischer Unterschied existierte zwischen Normaltieren und behandelten Tieren; der Wert der unbehandelten urämischen Gruppe lag signifikant unter den Werten aller anderen Gruppen (s. Tab. 8, S. 30).

Diskussion:

Postoperativ nahmen alle Tiere signifikant an Gewicht ab. Die mit Spironolactone behandelten subtotal nephrektomierten Tiere erreichten allerdings nach elftägiger Versuchsdauer nahezu wieder ihr Ausgangsgewicht (97 %; s. Tab. 1, S. 8). Die unbehandelten subtotal nephrektomierten Tiere lagen nach diesem Zeitraum signifikant unter ihrem Ausgangsgewicht und signifikant unter dem Körperendgewicht der spironolactone-behandelten subtotal nephrektomierten Tiere.

Qualitativ gleiche Beobachtungen waren auch von Schütterle et al. (19) gemacht worden. In diesem Versuch hatten die Ratten 11 Tage lang täglich 8 - 12 mg Spironolactone/100 g Kg ip., im Gegensatz zu uns aber erst vom 4. postoperativen Tag an, erhalten. Die Gewichtszunahme war bei den Tieren aller Gruppen nicht so ausgeprägt wie in unserem Versuch.

Die Gewichtsabnahme bei den subtotal nephrektomierten Tieren ist wie Leber et al. (14,15) in früheren Untersuchungen dargelegt haben in ihrem Ausmaß nicht auf den chirurgischen Eingriff als solchen, sondern auf die nach subtotaler Nephrektomie sich einstellende Niereninsuffizienz mit der ihr eigentümlichen Reduktion der spontanen Nahrungsaufnahme zurückzuführen.

Hungertiere (die in unseren Versuchen nicht berücksichtigt wurden, da bereits veröffentlichte (15) und unveröffentlichte Untersuchungen von Leber et al. vorliegen) durften nur 68 % des von urämischen Tieren aufgenommenen Futters erhalten, um einen gleichen Gewichtsverlust wie urämische Tiere zu erleiden. Wurde den Hungertieren die gleiche Menge an Futter wie urämischen Tieren zugeführt, resultierte eine geringere, aber trotzdem signifikante Gewichtsabnahme (15).

Weder der chirurgische Eingriff noch die verminderte Nahrungsaufnahme reichen aus, um die Gewichtsreduktion, wie sie bei urämischen Tieren beobachtet wird, zu erklären. Es müssen in der Urämie noch zusätzliche Faktoren wie z.B. mangelhafte Nahrungsutilisation und/oder

gesteigerter Stoffwechsel wirksam sein (15).

Spironolactone jedenfalls minderte signifikant bei urämischen Tieren diese Gewichtsabnahme wie der Vergleich behandelter und unbehandelter urämischer Tiere in Tab. 1, S. 8 zeigt.

Wie aus Tab. 2, S. 24 ersichtlich, bewirkte Spironolactone bei subtotal nephrektomierten Ratten hinsichtlich Nierengewicht, Niereneiweißgehalt oder Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen keine signifikante Änderung gegenüber unbehandelten urämischen Tieren.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den von Schütterle et al. (19) erhobenen Befunden, wobei es nach der oben angegebenen Spironolactonedosierung zu signifikant niedrigeren Harnstoffkonzentrationen und zu signifikant gesteigerter Regeneration des Nierenparenchymrestes bei subtotal nephrektomierten Tieren gegenüber der unbehandelten urämischen Gruppe gekommen war. Wir führen die unterschiedlichen Ergebnisse auf die unterschiedliche Spironolactonedosierung zurück, was aber noch näher abgeklärt werden muß.

Die gleichen Einbauraten von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in das Niereneiweiß (s. Tab. 3, S. 25) von operierten und nichtoperierten Tieren 2 und 6 Std. nach Markierung zeigen, daß der Einbau von Arginin-(Guanido-¹⁴C) bzw. die Eiweißsynthese der Niere weder durch die Urämie noch durch Spironolactone beeinflusst wurde. Bei statistisch nicht unterschiedlichen Einbauraten weisen die signifikant niedrigeren relativen Nierenproteingehalte (s. Tab. 2, S. 24) der urämischen Tiere in Verbindung mit dem Trend zur rascheren Aktivitätsabnahme (dpm/10 mg Prot. x min) 6 Std. nach Markierung daraufhin, daß der Eiweißabbau in der urämischen Niere wahrscheinlich gesteigert ist.

Der indirekte Schluß auf gesteigerten Eiweißabbau in der Niere urämischer Tiere, der sich durch Betrachtung der Einbauraten von Arginin-(Guanido-¹⁴C) und der relativen Nierenproteingehalte bei urämischen Tieren und Normaltieren ergibt, könnte durch weitere Meßzeitpunkte direkt belegt werden. Leider konnte aus finanziellen Gründen keine

größere Tierzahl markiert werden, die dieses Ergebnis mit Hilfe weiterer Meßzeitpunkte untermauert hätte.

Die behandelten Kontrolltiere wiesen höhere absolute (Signifikanz durch einfache Varianzanalyse nachgewiesen) und relative Nierenproteingehalte als die Normaltiere auf (s. Tab. 2, S. 24), was bei gleichen Einbau-raten beider Gruppen auf eine Abbauphemmung von Niereneiweiß unter dem Einfluß von Spironolactone hindeutet.

Spironolactonebehandlung bewirkte bei intakten Ratten keine signifikante Abweichung des absoluten Lebergewichts gegenüber Normaltieren. Erstaunlich ist, daß die behandelten subtotal nephrektomierten Tiere sich statistisch nicht signifikant von den intakten Gruppen unterschieden, während die unbehandelten subtotal nephrektomierten Tiere einen starken Abfall des absoluten Lebergewichts aufwiesen (s. Tab. 4, S. 26). Bei Betrachtung des relativen Lebergewichts übertraf die behandelte subtotal nephrektomierte Tiergruppe alle übrigen Gruppen (s. Tab. 4, S. 26).

Aus Untersuchungen von Leber et al. (15) ist zu ersehen, daß Hungertiere eine noch stärkere Gewichtsabnahme des absoluten und relativen Lebergewichts aufweisen als unbehandelte urämische Tiere. Unter Umständen läßt sich diese noch stärkere Lebergewichtsreduktion bei Hungertieren auf die um 32 % gegenüber urämischen Tieren verringerte Nahrungszufuhr zurückführen. Auch bei urämischen Tieren dürfte die Gewichtsreduktion der Leber zum größten Teil durch die geringe Nahrungsaufnahme bedingt sein. Behandelte urämische Tiere erreichten, trotz gegenüber Normaltieren weiter bestehender Körpergewichtsreduktion, das Lebergewicht von Normaltieren. Ob hier neben der Stoffwechselwirkung von Spironolactone auf die Leber auch noch ein Einfluß auf die Nahrungsaufnahme besteht, muß noch untersucht werden.

Andere Autoren haben bezüglich des absoluten und relativen Lebergewichts bei intakten und subtotal nephrektomierten Tieren nach Spironolactonegabe z. T. gleiche, z. T. auch gegensätzliche Beobachtungen gemacht.

Z.B. hatten Gerald und Feller (6) nach subkut. Inj. von Spironolactone (100 mg/kg Kg x d.; 3 Tage lang) eine signifikante Zunahme des relativen Lebergewichts (in % des Körpergewichts) bei intakten Mäusen gesehen. Eine wesentlich stärkere Zunahme des genannten Parameters verzeichneten die gleichen Autoren (4, 5) nach Gabe der doppelten Dosis Spironolactone über den gleichen Zeitraum.

Horvath et al. (9) hatten ebenfalls im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei normalen Ratten eine signifikante Gewichtszunahme der Leber nach Vorbehandlung mit Spironolactone (2×5 mg Ald.^x/100 g Kg x d.; insgesamt 5 Gaben durch Magensonde) erhalten.

Leber et al. (13) stellten nach ip. Inj. von Spironolactone (3×7 mg Ald./100 g Kg x d.; 8 Tage lang) bei normalen Ratten, ähnlich wie wir, keine signifikanten Unterschiede des absoluten und relativen Lebergewichts gegenüber unbehandelten Kontrolltieren fest.

Solymoss et al. (30) beschrieben nach peroraler Gabe von Spironolactone (2×3 μ mol Ald./100 g Kg x d.; 3 Tage lang) keine signifikanten Unterschiede des absoluten Lebergewichts gegenüber normalen Ratten. Die gleichen Autoren (32) fanden nach Erhöhung der Spironolactonedosis auf 2×20 μ mol/100 g Kg x d.; 3 Tage lang eine signifikante Zunahme des absoluten Lebergewichts.

Schütterle et al. (19) berichteten über eine signifikante Zunahme des relativen Lebergewichts nach Spironolactonegabe (8 - 12 mg Ald./100 g Kg x d.; ip., 11 Tage lang) bei intakten Ratten; zwischen behandelten und unbehandelten urämischen Tieren konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Die Mehrzahl der Autoren berichtet, unabhängig von der Applikationsform, nach Spironolactonegabe über eine Gewichtszunahme der Leber bei gesunden Tieren. Die Dosierung von Spironolactone scheint dabei eine Rolle zu spielen. Eine exakte Aussage darüber läßt sich allerdings erst nach weiteren Experimenten machen, wobei die unterschiedlichen Applikationsformen, Dosierungen und Dosierungszeiträume

^x: Ald. wird als Abkürzung für Aldactone gebraucht.

bezüglich ihrer Rückwirkungen auf die Lebergewichtszunahme miteinander verglichen werden.

Die gleichen statistischen Verhältnisse wie beim absoluten Lebergewicht waren auch beim absoluten Proteingehalt des Leberhomogenats anzutreffen (s. Tab. 4, S. 26). Die Spironolactonebehandlung urämischer Tiere führte so weit zur Normalisierung des Eiweißgehalts, daß er statistisch nicht von Normaltieren und behandelten Kontrolltieren abwich, aber signifikant höher lag als bei unbehandelten urämischen Tieren, was auch durch den relativen Proteingehalt (mg Protein/g Leber) bestätigt wurde (s. Tab. 4, S. 26).

Normalisierung des Eiweißgehaltes bei behandelten urämischen Tieren bezieht sich zunächst auf das quantitative Ergebnis.

Durch Injektion von Arginin-(Guanido-¹⁴C) versuchten wir zu klären, ob "Normalisierung des Proteingehaltes" durch Synthesesteigerung und/oder Abbauphemmung von Eiweiß unter dem Einfluß von Spironolactone zustande kommt. - Das uns aus dem Harnstoffzyklus bekannte Arginin eignet sich hierzu besonders, da nach erfolgtem Einbau in Eiweiß sich die Aktivitätsabnahme der radioaktiv markierten Guanidogruppe proportional dem Eiweißabbau verhält.- Erklärt wird dies dadurch, daß die Arginase die Guanidogruppe von Arginin abspaltet und Harnstoff als Stoffwechselendprodukt des Eiweißstoffwechsels aus ihr entsteht, der nicht erneut zur Eiweißsynthese verwandt wird. Als zweites Spaltprodukt kann Ornithin in den Harnstoffzyklus eingehen und Carbamylphosphat aufnehmen.

Da uns aus früheren Untersuchungen bekannt war, daß Spironolactone mikrosomale Enzyme intakter Ratten stimuliert (3-7, 10, 12, 13, 20-24, 26-29, 31-33), deren Aktivität bei urämischen Ratten vermindert ist (14, 15; s. auch Einleitung S. 1 u. 2), war die Einbaurate von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in das Eiweiß der Mikrosomenfraktion bei behandelten urämischen Ratten für uns von besonders großem Interesse. Daneben bestimmten wir auch noch die Einbaurate von Arginin-(Guanido-¹⁴C)

in das Eiweiß der Mitochondrienfraktion, um zu prüfen, ob Spironolactone auch hier über die Stimulierung bzw. Hemmung von Enzymen eine Änderung des Eiweißgehaltes bedingt.

Auf den Einbau von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in das Eiweiß der Mitochondrienfraktion haben weder Urämie noch Spironolactone einen Einfluß wie die gleichen Einbauraten bei allen Tiergruppen 2 Std. nach Markierung zeigten (s. Tab. 7, S. 29). Nach 6 Std. wurden allerdings Aktivitätsunterschiede zwischen intakten und subtotal nephrektomierten Tieren sichtbar, zumal bei den intakten, und hier wiederum besonders bei den behandelten Tieren, kaum eine Aktivitätsabnahme erfolgt war. Trotz gleicher Einbauraten bei allen Tiergruppen 2 Std. nach Markierung, fand sich bei der unbehandelten urämischen Tiergruppe ein erniedrigter Eiweißgehalt, der zusammen mit der herabgesetzten Einbaurrate 6 Std. nach Markierung seine Erklärung in einem gesteigerten Eiweißabbau finden kann (s. Tab. 5, 6, 7; S. 27, 28, 29).

Dies muß jedoch durch weitere Messungen von Einbauraten in größeren Zeitabständen von der Markierung abgeklärt werden.

Nicht so einfach zu begründen ist die Aktivitätsabnahme und der hohe Eiweißgehalt bei behandelten urämischen Tieren. Bei höherer Einbaurrate (s. Tab. 7, S. 29) wäre der Schluß naheliegend, daß gleichzeitig eine spironolactonebedingte gesteigerte Eiweißsynthese und ein urämiebedingter vermehrter Eiweißabbau vorliegen, wobei die Synthese stark überwiegt. Hier sind zusätzliche Untersuchungen angezeigt. Immerhin bewirkte Spironolactone bei behandelten urämischen Tieren einen absolut und relativ höheren Proteingehalt als bei Normaltieren (s. Tab. 5, 6; S. 27, 28).

Die behandelte Kontrollgruppe zeichnete ein hoher Eiweißgehalt und eine von den übrigen Gruppen 2 Std. nach Markierung nicht abweichende Einbaurrate aus (s. Tab. 5, 6, 7; S. 27, 28, 29). In Verbindung mit der geringen Aktivitätsabnahme 6 Std. nach Markierung kann dies im Vergleich mit Normaltieren als Eiweißabbauhemmung gedeutet werden.

Aber auch hier gilt das schon bei der Interpretation des Eiweißgehaltes und der Einbauraten bei urämischen Ratten. Gesagte, daß weitere Versuchsergebnisse zur Untermauerung dieser Hypothesen abgewartet werden müssen.

Künftige Untersuchungen in dieser Richtung müßten also eine Aussage darüber machen, ob das mitochondriale Eiweiß in der Urämie einem gesteigerten Abbau unterliegt und, ob Spironolactone diesen gesteigerten Abbau bremsen kann.

Ganz anders als die Einbauraten von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in das Nierenprotein (s. Tab. 3, S. 25) und in das Eiweiß der Mitochondrienfraktion (s. Tab. 7, S. 29) verhielten sich die Einbauraten bei der Mikrosomenfraktion (s. Tab. 8, S. 30). Im Gegensatz zu den in anderen Zellfraktionen bestimmten Einbauraten zeigte hier die unbehandelte urämische Gruppe einen stark herabgesetzten Einbau von Arginin-(Guanido-¹⁴C). Unter Berücksichtigung des gegenüber anderen Gruppen stark erniedrigten Eiweißgehaltes weist dies auf eine gehemmte mikrosomale Proteinsynthese bei unbehandelten urämischen Ratten hin (s. Tab. 5, 6, 8; S. 27, 28, 30). Umgekehrt führte eine Behandlung urämischer Ratten mit Spironolactone zu einer gesteigerten Einbaurate, die statistisch nicht signifikant von behandelten Kontrolltieren abwich. Der Eiweißgehalt behandelter urämischer Tiere zeigte keinen Unterschied zu Normaltieren. Auf Grund dieser Fakten kann eine Synthesesteigerung mikrosomalen Eiweißes durch Aldactone bei urämischen Ratten angenommen werden.

Wie schon gesagt, waren die Einbauraten der behandelten Gruppen gleich (s. Tab. 8, S. 30), lagen aber deutlich unter den Normaltieren, obwohl der Eiweißgehalt der behandelten Kontrolltiere den der Normaltiere signifikant übertraf (s. Tab. 5, 6; S. 27, 28) und die behandelten urämischen Tiere sich hinsichtlich ihres Eiweißgehaltes nicht von den Normaltieren unterschieden (s. Tab. 5, 6; S. 27, 28).

Dies läßt insbesondere bei intakten behandelten Tieren an eine Verlangsamung des Abbaues als auch der Synthese mikrosomalen Eiweißes

im Vergleich zu Normaltieren denken. Eine ähnliche Interpretation drängt sich bei der Betrachtung des Eiweißgehaltes und der Einbauraten 2 und 6 Std. nach Markierung bei unbehandelten urämischen Ratten auf (s. Tab. 5, 6, 8; S. 27, 28, 30). Allerdings ist eine exakte Interpretation des Eiweißabbaus erst durch weitere Meßwerte von Einbauraten möglich.

Neben der in der Urämie gehemmten spezifischen Aktivität mikrosomaler Enzyme (14, 15) bietet die bei urämischen Ratten verminderte mikrosomale Proteinsynthese wahrscheinlich eine weitere Erklärung für die Kumulation von lipophilen Verbindungen im Organismus urämischer Tiere. Die eingeschränkte Ausscheidungskapazität der Niere urämischer Tiere wird erst sekundär wirksam.

Vergleichende Untersuchungen beim Menschen (Urämiker mit und ohne Spironolactone), die sich diese Ergebnisse zunutze machen, wären hier sicherlich gerechtfertigt.

Gerald und Feller (6) hatten in dem auf S. 15 beschriebenen Versuch mit Mäusen nach Spironolactonegabe (100 mg Ald./kg Kg x d.; subkut.) eine signifikante Zunahme des mikrosomalen Proteingehalts/g Leber gefunden. Die doppelte Dosis Spironolactone ip. (4, 5) bewirkte eine geringere, aber ebenfalls signifikante Zunahme des mikrosomalen Proteingehalts gegenüber unbehandelten Kontrolltieren.

Leber et al. (13) verzeichneten nach ip. Gabe von 3 x 7 mg Ald./100 g Kg keinen signifikanten Unterschied im mikrosomalen Proteingehalt bei behandelten und unbehandelten Ratten.

Solymoss et al. (30) erzielten nach peroraler Verabreichung von 3 μ mol Ald./100 g Kg keinen Anstieg des mikrosomalen Proteingehalts bei Ratten. Die Verabfolgung von 20 μ mol Ald./100 g Kg durch die gleichen Autoren (32) bewirkte lediglich eine signifikante Zunahme des mikrosomalen Phospholipidgehalts, aber keine signifikante Änderung des mikrosomalen Proteingehalts. Die Dosierung von Spironolactone scheint, wie schon beim Niereneiweiß und Lebergewicht angenommen, auch auf den mikrosomalen Proteingehalt der Leber einen

nicht unerheblichen Einfluß auszuüben. Diese Vermutung muß jedoch durch Experimente belegt werden.

Aus Untersuchungen von Leber et al. (15) wissen wir, daß bei Hungertieren und urämischen Tieren die Verminderung des absoluten mikrosomalen Proteingehaltes gleich ist, aber, daß der relative Proteingehalt (mg mikrosomales Prot./g Leber) bei Hungertieren signifikant höher als bei urämischen Tieren liegt. - An anderer Stelle wurde schon erwähnt, daß die absolute und relative Lebergewichtsreduktion bei Hungertieren stärker als bei urämischen Tieren ausgeprägt ist. -

Der gleichen Untersuchung entnehmen wir, daß die Enzymaktivitäten mikrosomaler Enzyme der Hungertiere für die Aminopyrindemethylierung und die p-Hydroxylierung von Acetanilid den Normaltieren gleichen und die Demethylierung von p-Nitroanisol sogar um 25 % gegenüber Normaltieren gesteigert ist, während die gleichen Enzymaktivitäten bei urämischen Tieren gegenüber Hungertieren stark herabgesetzt sind.

Die quantitative Lebergewichtsreduktion bei Hungertieren und urämischen Tieren hat also qualitativ unterschiedliche Auswirkungen, wie die mikrosomalen Enzymaktivitäten beider Tiergruppen beweisen.

Spirolactone normalisiert Lebergewicht und mikrosomalen Proteingehalt bei urämischen Tieren. Weitere Experimente müssen klären wie sich die mikrosomalen Enzymaktivitäten urämischer Ratten unter Spirolactoneinfluß verhalten.

Ähnlich wie schon beim absoluten Eiweißgehalt des Leberhomogenates, der Mitochondrienfraktion und der Mikrosomenfraktion übertraf bei der behandelten urämischen Tiergruppe der absolute Eiweißgehalt der Hyaloplasmafraktion den der unbehandelten urämischen Tiergruppe signifikant (s. Tab. 5, S. 27). Der gegenüber der unbehandelten urämischen Gruppe signifikant niedrigere relative Proteingehalt weist allerdings daraufhin, daß für den höheren absoluten Proteingehalt dieser Tiergruppe alleine die größere Lebermasse verantwortlich ist (s. Tab. 6, S. 28). Auffällig ist weiterhin, daß der absolute Eiweiß-

gehalt der behandelten Kontrollgruppe sich nicht von dem der unbehandelten urämischen Gruppe unterscheidet und der relative Proteingehalt der behandelten Kontrollgruppe sogar den signifikant niedrigsten Wert aufweist. Man sieht fernerhin (s. Tab. 6, S. 28), daß der relative Proteingehalt unbehandelter urämischer Tiere und der Normaltiere gleich sind. Spironolactone scheint sich auf den Proteingehalt der Hyaloplasmafraktion mindernd auszuwirken, während die Urämie keinen oder einen leicht anhebenden Effekt auf den Proteingehalt hat.

Weitere Untersuchungen, die den Einbau von Arginin-(Guanido-¹⁴C) in Verbindung mit der Aktivitätsabnahme berücksichtigen, können die Ursachen näher beleuchten, die bei der Hyaloplasmafraktion zu derartig starken Abweichungen von den übrigen Fraktionen geführt haben.

Gerade das Beispiel der Hyaloplasmafraktion könnte dazu verleiten anzunehmen, daß Spironolactone die physikalischen Eigenschaften, also die Dichte einzelner Zellbestandteile so beeinflusst, daß z.B. in unserem Falle größere interfraktionäre Verschiebungen von Eiweiß zustande kommen, die zu völlig falschen Schlüssen Anlaß geben.

Leber et al. haben in unveröffentlichten Untersuchungen festgestellt, daß das Verhältnis der Aktivität sogenannter Leitenzyme (5-Nukleotidase für Plasmamembranen, Glucose-6-Phosphatase für Mikrosomenfraktion und die Succinatdehydrogenase für die Mitochondrienfraktion) zum jeweiligen Eiweißgehalt bei behandelten und unbehandelten Ratten gleich bleibt (der Grad der Verunreinigung der einzelnen Zellorganellen durch Beimengungen anderer Zellfraktionen war unabhängig von der Nierenfunktion und der Vorbehandlung).

Zusammenstellung der wesentlichsten Ergebnisse:

1. Nach elftägiger Versuchsdauer weisen die behandelten urämischen Tiere ein signifikant höheres Körperendgewicht als unbehandelte urämische Tiere auf.
2. Eine positive Beeinflussung der Proteinsynthese der Niere bzw. von Serumkreatinin- und Harnstoffkonzentrationen durch Spironolactone (2 x 3 mg Ald./100 g Kg x d.) wird mit dieser Dosierung bei subtotal nephrektomierten Ratten nicht erreicht.
3. Der Eiweißabbau ist in der urämischen Niere wahrscheinlich gesteigert. Spironolactone hat hierauf keinen Einfluß.
4. Bei behandelten Kontrolltieren ist der Niereneiweißabbau wahrscheinlich gehemmt, was zur signifikanten Zunahme des Eiweißgehaltes führt.
5. Spironolactone steigert das Lebergewicht von urämischen Tieren, nicht aber das von intakten Tieren.
6. Mit Ausnahme des Proteingehalts der Hyaloplasmafraktion normalisiert bzw. steigert Spironolactone den Proteingehalt subzellulärer Leberfraktionen bei subtotal nephrektomierten Ratten.
7. Der vermehrte Proteingehalt der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion bei behandelten Kontrolltieren und behandelten urämischen Ratten kommt durch Eiweißabbauhemmung zustande.
8. Der erniedrigte mitochondriale Eiweißgehalt in der Urämie resultiert aus einem gesteigerten Eiweißabbau; der erniedrigte mikrosomale Proteingehalt wird durch stark verringerte Eiweißsynthese hervorgerufen.
9. Der relative Eiweißgehalt der Hyaloplasmafraktion pro g Leber wird durch die Urämie nicht beeinträchtigt.

Schlußbetrachtung:

Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß die Stoffwechselwirkungen der Niereninsuffizienz auf die Leber mit ihren subzellulären Fraktionen, mit Ausnahme der Hyaloplasmafraktion, durch Spironolactone konträr beeinflußt werden. Die Spironolactonewirkung kommt mehr durch Hemmung des Eiweißabbaus als durch gesteigerte Eiweißsynthese zustande.

Die Niereninsuffizienz hat unterschiedliche Angriffspunkte bei den einzelnen subzellulären Leberfraktionen wie die Betrachtung der Proteingehalte und der Einbau von Arginin-(Guanido-¹⁴C) ergeben haben. Die häufige Minderung des Proteingehaltes in der Urämie kann sowohl durch Hemmung der Synthese als auch durch Steigerung des Abbaus hervorgerufen werden. Immerhin vermag Spironolactone vielfach eine Normalisierung des Eiweißgehaltes bei urämischen Tieren zu erzeugen. Die wesentlich stärkere Wirkung von Spironolactone auf den Proteingehalt von Leberzellfraktionen urämischer Ratten als auf den intakter Tiere legt den Gedanken nahe, daß Spironolactone hinsichtlich der Leberzellfraktionen u. U. die gleichen Stoffwechselschritte beeinflußt wie die Urämie. Für die Klärung dieser Zusammenhänge sind aber noch umfangreiche Untersuchungen erforderlich.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind natürlich nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Ein therapeutischer Versuch mit Spironolactone beim urämischen Menschen wäre allerdings gerechtfertigt, wenn die bei der urämischen Ratte verringerten mikrosomalen Enzymaktivitäten durch Spironolactone normalisiert werden und beim urämischen Menschen ebenfalls reduzierte mikrosomale Enzymaktivitäten vorliegen.

Tabelle 2

Anzahl der Tiere	Kontrolltiere n = 37	Kontrolltiere mit Ald. n = 46	Uräm. Tiere n = 37	Uräm. Tiere mit Ald. n = 46
Nierengewicht (mg)	1320, 9 $\pm$ 88, 4 $^+$	1270, 9 $\pm$ 93, 9 $^{0+}$	364, 4 $\pm$ 90 x	362, 5 $\pm$ 79 x
Relat. Nierengewicht (mg N/100 g Kg)	702, 5 $\pm$ 33, 5 $^+$	699, 9 $\pm$ 40, 3 $^+$	244, 0 $\pm$ 36 x	244, 1 $\pm$ 42 x
Regenerationsfaktor	-	-	1, 966 $\pm$ 0, 324 0	2, 031 $\pm$ 0, 386 0
Abs. Nierenprot. (mg)	160, 31 $\pm$ 16, 69 $^+$	174, 91 $\pm$ 21, 14 0	36, 80 $\pm$ 8, 51 x	37, 60 $\pm$ 6, 91 x
Relat. Nierenprot. (mg Prot./110mg N)	12, 19 $\pm$ 1, 37 $^+$	13, 68 $\pm$ 1, 08 0	10, 20 $\pm$ 1, 40 x	9, 60 $\pm$ 1, 80 x
Serumharnstoffkonz. (mg%)	37, 1 $\pm$ 5, 7 0	38, 3 $\pm$ 5, 5 0	179, 1 $\pm$ 50, 1 $^+$	177, 1 $\pm$ 45, 1 $^+$
Serumkreatininkonz. (mg%)	0, 4 $\pm$ 0, 1 0	0, 4 $\pm$ 0, 1 0	1, 6 $\pm$ 0, 4 $^+$	1, 4 $\pm$ 0, 3 $^+$

Signifikanz: p < 0, 01; + gegenüber 0, o gegenüber x, o gegenüber x, o $^+$ gegenüber x, p < 0, 02;
+ gegenüber o $^+$

Einfluß von Aldactone (2 x 3 mg/100 g KG x d.; ip. 11 Tage lang) auf Nierengewicht, Nierenweiß
und Parameter der Nierenfunktion bei Kontrolltieren und subtotal nephrektomierten Tieren.

Tabelle 3

Nierenhomogenatprot.

Markierungszeit 2 h		Kontrolltiere		Kontrolltiere mit Ald.		Uräm. Tiere		Uräm. Tiere mit Ald.	
Anzahl der Tiere		n = 6		n = 8		n = 8		n = 8	
dpm/10 mg Prot. x min		35 383 + <u> </u>	4222°	33 441 + <u> </u>	4769°	32 305 + <u> </u>	3133°	33 109 + <u> </u>	3262°
Markierungszeit 6 h		Kontrolltiere		Kontrolltiere mit Ald.		Uräm. Tiere		Uräm. Tiere mit Ald.	
Anzahl der Tiere		n = 6		n = 6		n = 6		n = 6	
dpm/10 mg Prot. x min		22 100 + <u> </u>	2411°	22 665 + <u> </u>	2305°	19 768 + <u> </u>	2631°	19 955 + <u> </u>	2025°

Einfluß von Aldactone (2 x 3 mg/100 g Kg x d.; ip., 11 Tage lang) auf die Einbauraten von Arginin-¹⁴C (Guanido-¹⁴C) in das Nierenweiß von Kontrolltieren und subtotal nephrektomierten Ratten 2 und 6 Std. nach ip. Injektionen von 15 µCi/100 g Kg.

Tabelle 4

Anzahl der Tiere	Kontrolltiere n = 37	Kontrolltiere mit Ald. n = 46	Uräm. Tiere n = 37	Uräm. Tiere mit Ald. n = 46
Lebergewicht (g)	7, 1 $\pm$ 1, 0 $^{\circ}$	7, 0 $\pm$ 0, 8 $^{\circ}$	5, 5 $\pm$ 0, 6 $^{+}$	6, 6 $\pm$ 0, 7 $^{\circ}$
g Leber / 100 g Kg	3, 8 $\pm$ 0, 3 $^{\circ}$	3, 9 $\pm$ 0, 3 $^{\circ}$	3, 6 $\pm$ 0, 3 $^{\circ}$	4, 5 $\pm$ 0, 4 $^{+}$
Leberhomogenat				
Proteingehalt (mg)	1351, 4 $\pm$ 141 $^{\circ}$	1396, 0 $\pm$ 166 $^{\circ}$	1033, 3 $\pm$ 183 $^{+}$	1340, 0 $\pm$ 147 $^{\circ}$
mg Prot./g Leber	191, 5 $\pm$ 24, 4 $^{\times}$	199, 4 $\pm$ 32, 2 $^{\times}$	187, 9 $\pm$ 21, 6 $^{\circ}$	200, 6 $\pm$ 25, 9 $^{\times}$

Signifikanz: p < 0, 01: o gegenüber +; p < 0, 02: x gegenüber o

Einfluß von Aldactone (2 x 3 mg/100 g Kg x d.; ip., 11 Tage lang) auf Lebergewicht, relat. Lebergewicht, abs. und relat. Proteingehalt des Leberhomogenates bei Kontrolltieren und sub-total nephrektomierten Tieren.

Tabelle 5

Anzahl der Tiere	Kontrolltiere n = 37	Kontrolltiere mit Ald. n = 46	Uräm. Tiere n = 37	Uräm. Tiere mit Ald. n = 46
Abs. Prot. -Gehalt subzellulLeberfraktionen				
12 000 g Sediment (mg)	785 $\pm$ 82 ⁰	883 $\pm$ 95 ⁺	575 $\pm$ 88 ^x	832 $\pm$ 92 ⁺⁰
105 000 g Überstand (mg)	475 $\pm$ 50, 0 ⁰	397, 4 $\pm$ 59, 2 ⁺	384, 8 $\pm$ 36, 4 ⁺	424, 3 $\pm$ 45, 2 ^x
105 000 g Sediment (mg)	93, 0 $\pm$ 15, 0 ⁰	107, 9 $\pm$ 16, 1 ⁺	66, 1 $\pm$ 14, 1 ^x	88, 3 $\pm$ 15, 8 ⁰
Homogenat (mg)	1359 $\pm$ 141 ⁰	1396 $\pm$ 166 ⁰	1033 $\pm$ 183 ⁺	1340 $\pm$ 147 ⁰
Mikrosomenprot. in % des Homogenatprot.	6, 84 $\pm$ 0, 39 ⁰	7, 75 $\pm$ 0, 24 ⁺	6, 38 $\pm$ 0, 23 ^{xx}	6, 58 $\pm$ 0, 44 ⁺⁺

Signifikanz: $p < 0, 01$: o gegenüber +, o gegenüber x, o gegenüber xx, o gegenüber ++, + gegenüber x, + gegenüber xx, + gegenüber ++, x gegenüber +o

$p < 0, 02$: o gegenüber +o, xx gegenüber ++

$p < 0, 05$: + gegenüber +o

Einfluß von Aldactone (2 x 3 mg/100 g Kg x d.; ip., 11 Tage lang) auf den absoluten Proteingehalt subzellulärer Leberfraktionen bei Kontrolltieren und subtotal nephrektomierten Tieren.

Tabelle 6

Anzahl der Tiere	Kontrolltiere n = 37	Kontrolltiere mit Ald. n = 46	Uräm. Tiere n = 37	Uräm. Tiere mit Ald. n = 46
Relat. Prot.-Gehalt subzellul. Leberfraktionen				
12 000 g Sediment mg Prot./g Leber	110,5 ± 8,5 ^o	124,7 ± 12,7 ⁺	104,7 ± 8,9 ^{xo}	126,0 ± 12,8 ⁺
105 000 g Überstand mg Prot./g Leber	67,0 ± 6,2 ^{x+}	56,8 ± 5,8 ⁺	69,9 ± 9,2 ^o	64,3 ± 7,8 ^{o+}
105 000 g Sediment mg Prot./g Leber	13,1 ± 1,8 ^o	15,4 ± 1,5 ⁺	12,0 ± 1,9 ^x	13,4 ± 1,2 ^o

Signifikanz: p < 0,01: o gegenüber +, o gegenüber x, o gegenüber o+, + gegenüber xo, + gegenüber x+,
+ gegenüber o+, + gegenüber x
p < 0,05: o gegenüber xo

Einfluß von Aldactone (2 x 3 mg/100 g Kg x d.; ip., 11 Tage lang) auf den relativen Proteingehalt
subzellulärer Leberfraktionen bei Kontrolltieren und subtotal nephrektomierten Tieren.

Tabelle 7

Mitochondrienfraktion

Markierungszeit 2 h		Markierungszeit 6 h	
Anzahl der Tiere	Kontrolltiere n = 6	Anzahl der Tiere	Kontrolltiere n = 7
dpm/10 mg Prot. x min	7879+1263 ^o	dpm/10 mg Prot. x min	5053, 8+736, 3 ^o
Kontrolltiere mit Ald.		Kontrolltiere mit Ald.	
n = 6	6698+767 ^o	n = 6	6321, 5+394, 6 ⁺
Uräm. Tiere mit Ald.	7198+1944 ^o	Uräm. Tiere mit Ald.	3427, 3+1501, 0 ^{+o}
n = 8		n = 9	

Signifikanz: $p < 0,01$: o gegenüber +, o gegenüber x, + gegenüber x, + gegenüber +o,
 $p < 0,05$: o gegenüber +o

Einfluß von Aldactone (2 x 3 mg/100 g Kg x d.; ip., 11 Tage lang) auf die Einbausraten von Arginin-¹⁴C in das Protein der Lebermitochondrienfraktion von Kontrolltieren und subtotal nephrektomierten Ratten 2 und 6 Std. nach ip. Injektionen von 15 μ Ci/100 g Kg.

Tabelle 8

Lebermikrosomenprot.

Markierungszeit 2 h		Kontrolltiere	Kontrolltiere mit Ald.	Uräm. Tiere	Uräm. Tiere mit Ald.
Anzahl der Tiere		n = 6	n = 8	n = 7	n = 8
dpm/10 mg Prot. x min		15 369 $\pm$ 1723 ^o	10 692 $\pm$ 1631 ⁺	5 970 $\pm$ 2470 ^x	11 387 $\pm$ 1747 ⁺
Markierungszeit 6 h					
Anzahl der Tiere		n = 8	n = 8	n = 6	n = 6
dpm/10 mg Prot. x min		9028, 2 $\pm$ 950 ^o	9445, 1 $\pm$ 679, 1 ^{o+}	4084, 3 $\pm$ 576, 2 ⁺	8036, 3 $\pm$ 806, 8 ^{oo}

Signifikanz: $p < 0,01$: o gegenüber +, o gegenüber x, + gegenüber x, + gegenüber o+, + gegenüber oo,
o+ gegenüber oo

Einfluß von Aldactone (2 x 3 mg/100 g Kg x d.; ip., 11 Tage lang) auf die Einbausraten von Arginin-
(Guanido-¹⁴C) in das Lebermikrosomenprotein von Kontrolltieren und subtotal nephrektomierten
Ratten 2 und 6 Std. nach ip. Injektionen von 15 μ Ci/100 g Kg.

Literatur:

1. Bode, Ch.; Goebell, H.; Stähler, E.: Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung nach der Biuret-methode.
Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem. 6: 418-421, 1968
2. Beisenherz, G.; Boltze, H. J.; Bücher Th.; Czok, R.; Garbade, K. H.; Meyer-Arend, E.; Pfeleiderer, G.: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforschung 8b: 555-575, 1953
3. Buck, S. H.; Lage, G. L.: Possible Mechanism of the Prevention of Digitoxin Toxicity by Spironolactone in the Mouse.
Arch. int. Pharmacodyn. 189: 192-197, 1971
4. Feller, D. R.; Gerald, M. C.: Interactions of spironolactone with hepatic microsomal drug metabolizing enzyme systems.
Biochem. Pharmacol. 20: 1991-2000, 1971
5. Feller, D. R.; Gerald, M. C.: Stimulation of liver microsomal drug metabolism in male and female mice by spironolactone and aldadiene.
Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 136: 1347-1350, 1971
6. Gerald, M. C.; Feller, D. R.: Evidence for spironolactone as a possible inducer of liver microsomal enzymes in mice.
Biochem. Pharmacol. 19: 2529-2532, 1970
7. Gerald, M. C.; Feller, D. R.: Stimulation of barbiturate metabolism by spironolactone in mice.
Arch. int. Pharmacodyn. 187: 120-124, 1970
8. Hicks, J. M.; Wooton, I. D. P.; Young, D. S.: The effect of phenolic compounds on cerebral enzymes.
Biochem. J. 82: 29P, 1962
9. Horvath, E.; Somogyi, A.; Kovacs, K.: Effect of spironolactone on the regeneration ability of the liver in rats.
Klin. Wochenschr. 48: 385-387, 1970

10. Kovacs, K.; Somogyi, A.: Prevention by spironolactone of 7,12-dimethyl-benzynthracene induced adrenal necrosis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131: 1350-1352, 1969.
11. Kovacs, K.; Blaschek, J.A.; Gardell, C.: Spironolactone-induced proliferation of smooth-surfaced endoplasmatic reticulum in the liver of rats.
Z. Gesamte Experiment. Med. 152: 104-110, 1970
12. Kovacs, K.; Somogyi, A.: Suppression by spironolactone of 7,12-dimethylbenzynthracene-induced mammary tumors.
Eur. J. Cancer 6: 195-201, 1970
13. Leber, H.W.; Rawer, P.; Schütterle, G.: Beeinflussung mikrosomaler Enzyme der Rattenleber durch Spironolacton, Etacrynsäure und Furosemid.
Klin. Wochenschr. 49: 116-118, 1971
14. Leber, H.W.; Streitzig, P.; Kayser, M.; Schütterle, G.:
Der Einfluß der Urämie auf Arzneimittel abbauende Enzyme in Rattenlebermikrosomen.
Klin. Wochenschr. 49: 944-946, 1971
15. Leber, H.W.; Schütterle, G.: Oxydative drug metabolism in liver microsomes from uremic rats.
Kidney international 2: 152-158, 1972
16. Müting, D.: Über Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung des enteweißten Liquor cerebrospinalis bei Leber- und Niereninsuffizienz.
Klin. Wochenschr. 38: 1000, 1960
17. Omura, T.; Siekevitz, P.; Palade, G.E.: Turnover of constituents of the endoplasmatic reticulum membranes of rat hepatocytes.
J. biol. Chem. 242: 2389-2396, 1967
18. Renner, D.; Heintz, H.: Metabolic changes in uremia.
4. Int. Congr. Nephrol., Stockholm, 1969, vol. 2, p. 248

19. Schütterle, G.; Luboeinski, H. P.; Leber, H. W.; Platt, D.:
Spironolacton-Behandlung subtotal nephrektomierter Ratten
unter Berücksichtigung des PVC-Granuloms.
Symp. über Aldosteron u. Aldosteron-Antagonisten,
Nizza 29. 9. - 1. 10. 1971
20. Selye, H.; Mandevice, R.; Yeghiayan, E.: On the catatoxic effect
of antimineralocorticoids.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266: 34-42, 1970
21. Selye, H.: Inhibition of anesthesia by steroids.
J. Pharmacol. exp. Ther. 174: 478-486, 1970
22. Selye, H.: Hormones and resistance.
J. Pharmaceutical Sciences, Vol. 60, No. 1, 1971
23. Selye, H.: Effect of catatoxic steroids upon established morbid
changes.
Experientia 27/12, 1445-1446, 1971
24. Solymoss, B.; Classen, H. G.; Varga, S.: Increased hepatic micro-
somal activity induced by spironolactone and other steroids.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132: 940-942, 1969
25. Solymoss, B.; Krajny, M.; Varga, S.: Independence of anti-
mineralocorticoid and catatoxic effects of various steroids.
J. Pharm. Sci. 59: 712-714, 1970
26. Solymoss, B.; Varga, S.; Krajny, M.; Werringloer, J.:
Influence of spironolactone and other steroids on the enzymatic
decay and anticoagulant activity of bishydroxycoumarin.
Thromb. Diath. Haemorrh. 23: 562-568, 1970b
27. Solymoss, B.; Toth, S.; Varga, S.; Krajny, M.: The influence of
spironolactone on its own biotransformation.
Steroids 16: 263-275, 1970
28. Solymoss, B.; Varga, S.; Krajny, M.: Effect of spironolactone,
norboletone, progesterone, hydroxydione und β -diethylamino-
ethyl diphenyl-propylacetate on the disappearance rate of
indomethacin from blood.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 21, Nr. 3: 384-386, 1971

29. Solymoss, B.; Krajny, M.; Varga, S.; Werringloer, J.:
Suppression by nucleic acid- and protein-synthesis inhibitors
of drug detoxication induced by spironolactone or ethylestrenol.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 174: 473-477, 1970d
30. Solymoss, B.; Werringloer, J.; Toth, S.: The influence of pregneno-
lone-16-carbonitrile on hepatic mixed-function oxygenases.
Steroids, 17: 427-433, 1971a
31. Solymoss, B.; Toth, S.; Varga, S.; Selye, H.: Protection by spirono-
lactone and oxandrolone against chronic digitoxin or indo-
methacin intoxication.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, No. 4:586,592, 1971b
32. Solymoss, B.; Toth, S.; Varga, S.; Werringloer, J.; Zsigmond, G.:
Effect of spironolactone and ethylestrenol on benzo(a)pyrene
hydroxylase (EC 1.14.1.1) and other chemical constituents of
hepatic microsomes.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 48: 841-846, 1971
33. Somogyi, A.; Kovacs, K.: Inhibition by spironolactone of 7-hydroxy-
methyl-12-methylbenz(a)anthracene-induced adrenal necrosis
in rats.
Endokrinologie, 56: 245-247, 1970
34. Stripp, B.; Hamrick, M.E.; Zampaglione, N.G.; Gillette, J.R.:
The effect of spironolactone on drug metabolism by hepatic
microsomes.
J. Pharmacol. Exp. Therapeut., Vol. 176, No. 3: 766-771, 1971
35. Stripp, B.; Hamrick, M.E.; Zampaglione, N.G.: Effect of spirono-
lactone treatment of rats on the oxidation of drugs by liver
microsomes.
Fed. Proc., 29: 346, 1970
36. Talcott, R.E.; Stohs, S.J.: Metabolism of aniline and hexobarbital
by liver homogenates of spironolactone-pretreated male rats.
J. Pharm. Sci., 61: 296-297, 1972

37. Young, D.S.; Wooton, I.D.P.: Conjugation of aromatic amines
in renal failure.
Clin. Chem. Acta 22: 403, 1968
38. Mason, H.S.; North, J.C.; Vanneste, M.: Microsomal mixed-
function oxidations: the metabolism of xenobiotics.
Fed. Proc. 24: 1172, 1965

Lebenslauf:

Ich wurde am 1. 5. 1946 als Sohn des Dr. med. Waldemar Radny und seiner Ehefrau Hildegard in Marburg/Lahn geboren. Dort verlebte ich die ersten 4 Jahre meiner Kindheit. 1950 zogen wir nach Usenborn, einem kleinen Ort im Kreis Büdingen, wo mein Vater eine Landpraxis eröffnete.

Ab dem Jahre 1952 besuchte ich dort die Volksschule und 1956 wurde ich Sextaner des Wolfgang-Ernst-Gymnasiums in Büdingen. 1959 verlegte mein Vater seinen Praxissitz in das für ihn zentraler gelegene Gelnhaar (ebenfalls ein Ort im Kreis Büdingen).

1966 legte ich am Wolfgang-Ernst-Gymnasium die Reifeprüfung ab und begann das Studium der Medizin in Marburg/Lahn.

1967 absolvierte ich das Vorphysikum und 1968 das Physikum. Nach dem Physikum in Marburg setzte ich den klinischen Teil meines Studiums an der Justus Liebig-Universität in Gießen fort.

Am 25. 7. 1969 heiratete ich die Studentin der Erziehungswissenschaften, Erika Jost. Am 22. 12. 1970 wurde unser Sohn Thomas geboren.

Im Januar 1972 schloß ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab und im Februar 1972 fing ich als Medizinalassistent in der medizinischen Klinik in Gießen an.

Durch die freundliche Unterstützung von Prof. Dr. G. Schütterle und Dr. med. habil. H.-W. Leber konnte ich im Mai 1972 mit dem experimentellen Teil meiner Doktorarbeit beginnen. Im November 1972 setzte ich den chirurgischen Teil meiner Medizinalassistentenausbildung in der chirurgischen Klinik in Gießen fort.

Am 1. 3. 1973 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt und am 12. 3. 1973 wurde ich zur Bundeswehr eingezogen. Seit dem 1. 4. 1973 bin ich als Stabsarzt im Bundeswehrkrankenhaus in Gießen tätig.

